



TITLE:

Studies on Quality Evaluation of
Biopharmaceuticals by Chromatographic
and Electrophoretic Techniques(
Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Kubota, Kei

CITATION:

Kubota, Kei. Studies on Quality Evaluation of Biopharmaceuticals by Chromatographic and Electrophoretic Techniques. 京都大学, 2018, 博士(工学)

ISSUE DATE:

2018-03-26

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k21072>

RIGHT:

許諾条件により本文は2018-09-30に公開

京都大学	博士（工学）	氏名	久保田 圭
論文題目	Studies on Quality Evaluation of Biopharmaceuticals by Chromatographic and Electrophoretic Techniques (クロマトグラフィー及び電気泳動技術によるバイオ医薬品の品質評価に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>本論文は、バイオ医薬品の品質評価に資する分析技術として、クロマトグラフィー及び電気泳動法を駆使した新規分離分析技術の開発に関する研究成果をまとめたものであり、序論を含む本編 5 章及び総括からなっている。</p> <p>第 1 章は序論であり、バイオ医薬品の品質評価に用いられる高速液体クロマトグラフィー (HPLC) やキャピラリー電気泳動 (CE) などの分離分析技術は、各製品の品質特性を理解し、適切な製造条件や保存条件を管理する為に重要であり、バイオ医薬品開発において大きな役割を果たしているが、半面、分子サイズ、電荷プロファイル、糖鎖プロファイルなどにおいて複雑な不均一性を有するバイオ医薬品を評価するには、既存の分離分析技術では、分離性能、分離選択性などが乏しいという問題があることを述べている。その上で、バイオ医薬品で生じる各種不均一性をより簡便、効率的に評価可能な新規分離分析技術の開発が重要であることを強調し、本論文で著されている研究の背景や目的、意義、位置づけなどを述べている。</p> <p>第 2 章では、抗体医薬品及び抗体薬物複合体 (Antibody-drug conjugate; ADC) の分離に対するキャピラリーゾーン電気泳動法 (CZE) の開発を行っている。抗体医薬品と同様に、ADC の電荷プロファイルは、その製造や保存中に変化することが知られている。一般に、抗体医薬品の電荷プロファイルの評価においては、陽イオン交換クロマトグラフィー法 (CEX) が汎用されているが、ADC の分析に CEX を適用した場合、低分子薬物の結合にともなう疎水性・複雑性の増加により、分離能及び分離の再現性が著しく低下するという欠点があった。そこで、新たな CZE 手法を開発し分離性能を検討したところ、従来の CEX よりもより高い分離能・再現性が得られ、品質評価として用いる分析法として妥当な性能を有していることが確認されたことを述べている。</p> <p>第 3 章では、硫酸ドデシルナトリウムーキャピラリーゲル電気泳動法 (SDS-CGE) において検出された抗体医薬品断片体の同定及び構造解析を行っている。抗体医薬品の分子サイズの評価においては、分離能の高い SDS-CGE が汎用されるが、検出されたピークを直接構造解析することは技術的に困難であるため、同定及び構造解析手法に課題があった。そこで本研究では、熱による劣化によって新たに生成した不純物ピークについて、従来から使用されている 2 つの手法、すなわち (1) インゲル消化ペプチドマップ法による構造解析手法、及び(2) 逆相高速液体クロマトグラフィー (逆相 HPLC) による構造解析手法に加え、市販の分取装置を用いた構造解析手法を新たに導入・検討している。全ての手法において同様の構造解析結果の取得が可能であったが、市販分取装置を用いることで、一度に大量のピークを分取し、効率的に構造解析ができることが明らかとなったことを示している。</p>			

第4章では、新規素材であるスポンジモノリス (SpM) にプロテイン A 及びペプシンを固定化し、それを HPLC の分離カラムに適用して、タンパク質間の親和性反応を評価している。抗体医薬品の HPLC による精製段階においては、通常市販のプロテイン A カラムが汎用されるが、そのカラムのコストや分析スループットの低さが課題となっていた。一方、モノリスカラムはその貫通孔を有する骨格構造から、ハイスループット分析に適していると言われていたが、一般にシリカ基材などを用いたゾルゲル反応によって合成されるため、孔径の制御やカラムのスケールアップが容易ではないという欠点も指摘されていた。そこで本研究では、熱可塑性樹脂と水溶性のポアテンプレートとを融点以上で混合するだけで合成可能な、安価かつスケールアップ成型の容易な SpM を基材とするカラムを開発し、さらにこの SpM にエポキシ基を導入し、プロテイン A 及び消化酵素であるペプシンを通液後に静置することによって、これらが安定して固定化されることを見出している。また、プロテイン A またはペプシンを固定化した SpM を HPLC カラムに適用し、試料溶液を高流速で通液した際にも、抗体医薬品との結合反応や消化反応が確認され、タンパク質間の迅速な反応場のプラットフォームとして使用可能であることを示している。

第5章では、ポリエチレングリコール (PEG) を基材とし、分子ふるい効果を制御した CGE により、DNA や抗体医薬品の N 結合型糖鎖の分析を行っている。従来のゲル電気泳動においては、アガロースゲルやポリアクリルアミドが汎用されていたが、アガロースゲルは小さい分子量差を分けるのが困難な点、ポリアクリルアミドゲルは分離可能な分子量範囲に制限がある点、アクリルアミドモノマーに生体毒性がある点、アミド基による非特異吸着がある点などが課題となっていた。PEG は生体毒性、非特異吸着などの欠点がなく、さらにエチレンオキシド (EO) 数の異なる PEG が市販されている点などから、魅力的な分離媒体と考えられ、本研究では、EO 数濃度を変更した CGE 用キャピラリーを作成した後、グルコースラダー及び DNA ラダーを分析することで、最適な分子量範囲を評価している。さらに抗体医薬品の N 結合型糖鎖を分析し、CGE 分析に利用できることも明らかにしている。

最後は総括であり、本論文の内容をまとめるとともに、バイオ医薬品の品質評価に資する分析手法の開発における本論文の位置づけと、将来へ向けた課題についても言及している。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、バイオ医薬品の品質評価に資する分析技術として、クロマトグラフィー及び電気泳動法を駆使した新規分離分析技術の開発に関する研究成果をまとめたものであり、主な成果は次のとおりである。

- 1) 抗体薬物複合体の電荷プロファイル評価にキャピラリーゾーン電気泳動法を適用することで、従来の陽イオン交換クロマトグラフィー法に比べ、低分子薬物の結合にともなう疎水性・複雑性の増加による分離能及び再現性が飛躍的に改善し、品質評価法として妥当な性能を有していることを明らかにした。
- 2) 硫酸ドデシルナトリウムーキャピラリーゲル電気泳動法において検出された抗体医薬品断片体の同定及び構造解析のために、市販分取装置を用いた新規構造解析手法を開発し、大量のピーク分取と効率的な構造解析が可能であることを明らかにした。
- 3) 新規分離素材であるスポンジモノリスにプロテイン A 及びペプシンをそれぞれ固定化し、液体クロマトグラフィーの分離カラムとすることで、簡便で迅速なタンパク質間の新規親和性反応評価法の構築が可能となることを示した。
- 4) ポリエチレングリコールを分離基材とし、分子ふるい効果を制御したキャピラリーゲル電気泳動手法を開発し、これを DNA や抗体医薬品の N 結合型糖鎖の分析へ適用して、同手法による抗体医薬品の糖鎖解析の可能性を示した。

以上要するに、本論文はクロマトグラフィー及び電気泳動法に基づくバイオ医薬品の新規品質評価法の開発についての新たな知見をまとめたものであり、学術上、実際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 30 年 1 月 25 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。